

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ORIGINE
DES
ANTICORPS TYPHIQUES

PAR

LE Dr LADISLAS DEUTSCH

De la Faculté médicale de Budapest.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

On commence à pénétrer le mécanisme de production des substances antagonistes chargées de contre-balancer l'influence nocive des microbes. Les récents travaux de M. Bordet, relatifs aux sérum antihématiques, ont montré que l'organisme agit de la même façon contre les substances inoffensives non bactériennes et contre les substances bactériennes nocives. Dans les deux cas, il y a formation d'anticorps, et en apparence par les mêmes règles.

Nous connaissons déjà un grand nombre de ces anticorps préparés par l'organisme. Aux antitoxines, aux anticorps préventifs, aux agglutinines, aux corps antipeptiques, nous ajouterons désormais les différentes substances antihématiques, les substances du lactosérum qui précipitent le lait, les antiprésures, les antitoxines du venin des serpents, du sérum d'anguille, de la ricine, de l'abrine, etc., c'est-à-dire une série de substances qui s'augmente indéfiniment.

La formation de tous ces corps semble suivre les mêmes règles, ou du moins présenter beaucoup d'analogies. Elle ne peut se faire en dehors de l'organisme : elle semble liée à la vie des cellules, auxquelles une certaine excitation semble nécessaire.

Quelles sont les cellules de l'organisme qui se chargent de cette besogne ? Voilà une question posée depuis longtemps.

On s'adressa d'abord aux antitoxines. MM. Wassermann et Takaki, en découvrant la faculté que possèdent les cellules du cerveau de fixer la toxine tétanique, ont cru avoir trouvé dans ces cellules mêmes l'endroit de formation des antitoxines solubles ; cette opinion fut reconnue inexacte par MM. Metchnikoff et Marie. A l'heure actuelle, il n'y a pas un seul fait qui prouve que ce sont les cellules spécialement attaquées par la toxine qui produisent les antitoxines.

C'est incontestablement un grand mérite pour MM. Pfeiffer et Marx¹, d'avoir étudié le lieu de formation des anticorps cholériques qu'on trouve chez les jeunes lapins déjà 2-3 jours après une injection immunisante. Ces savants ont réussi à démontrer que ce sont les organes lymphoïdes, la moelle des os, les ganglions et principalement la rate, qui fabriquent les anticorps. Les agglutinines sembleraient suivre les mêmes règles que les corps préventifs.

Ces résultats ont été confirmés par M. A. Wassermann pour les anticorps Eberthiens², et ensuite par MM. Wassermann pour les corps antipneumococciques (moelle des os) ; quant aux agglutinines, ils sont confirmés par M. Van Emden³ pour le bacille aérogène, niés tout récemment par Rath⁴ pour le bacille d'Éberth.

Depuis le printemps 1898, nous avons travaillé, dans le laboratoire de M. Metchnikoff, à résoudre la dite question pour le bacille de la fièvre typhoïde ; que notre cher maître reçoive ici l'expression de notre plus vive reconnaissance pour l'intérêt avec lequel il a suivi notre travail dans toutes ses phases, et

1. *Zeitschrift für Hygiene*, tome 27, 1890. *Deutsche med. Wochenschrift*, 1898, N° 3.

2. A. WASSERMANN, *Berliner klin. Wochenschrift*, 1898, n° 40.

3. M. WASSERMANN, *Deutsche med. Wochenschrift*, 1899, 9.

4. VAN EMDEN, *Zeitschrift f. Hygiene*, XXX, n° 1.

5. RATH, *Centralblatt für Bakteriologie*, 1899, 15/16.

pour les multiples et précieux conseils qu'il a bien voulu nous donner.

PREMIÈRE PARTIE

RECHERCHES SUR L'ORIGINE DES CORPS PRÉVENTIFS ANTITYPHIQUES

Le plan de notre travail était de déterminer d'un côté le développement des anticorps dans le sérum, et d'évaluer d'autre part la valeur préventive des organes du même animal immunisé, pour trouver les organes qui sont en relation avec la formation des anticorps. Parallèlement à ces recherches, nous avons également suivi attentivement la formation des agglutinines, dont les relations prochaines avec les immunisines sont bien connues.

Les animaux d'expérience (cobayes) forment-ils des anticorps après une seule injection d'une culture typhique ? Voilà la première question à résoudre. Nous avons observé qu'une seule injection provoque parfaitement l'apparition des anticorps dans le sérum, à la condition d'être faite dans le péritoine, avec une culture entière sur gélose, chauffée pendant 1 heure à 66°.

Après avoir remarqué que la valeur préventive d'un sérum dépend en quelque mesure de la masse de culture injectée, nous avons injecté, à une série d'animaux, deux cultures (âgées de 24 heures) chauffées. Mais beaucoup d'animaux ne supportent guère cette masse bactérienne, et réagissent quelquefois en montrant les symptômes de l'intoxication typhique, un abaissement de température rapide et considérable, et un collapsus des plus accentués; d'autres cobayes ont succombé à une infection secondaire, due à d'autres espèces de microbes, qui ont envahi les animaux affaiblis par l'intoxication chronique.

Repris alors notre dose initiale d'une culture chauffée, nous nous en sommes servi pendant toutes nos recherches.

Expliquons d'abord la méthode de titrage des corps préventifs, et les circonstances — jusqu'ici peu décrites — dont l'observation rigoureuse est absolument indispensable. Nous nous sommes servi du procédé de M. Pfeiffer, qui, en appliquant la méthode de M. Ehrlich, nous a appris le premier à mesurer exactement la valeur immunisante d'un sérum anti-infectieux.

On ajoute des doses croissantes du sérum à un virus plusieurs fois sûrement mortel, on injecte les mélanges dans le péritoine des cobayes, qu'on observe ensuite attentivement. Les précautions, qui sont à prendre, se rapportent d'un côté au virus, d'autre côté aux animaux d'expérience.

Quant au virus, notre échantillon de bacilles d'Éberth, mis gracieusement à notre disposition par notre confrère, M. Cantacuzène, provenait de la rate d'un malade typhique ; il ne montrait que des qualités de virulence assez faibles. Il nous fallait une douzaine de passages de cobaye à cobaye, dont quelques-uns à l'aide de sacs de collodion, pour exalter la virulence à un degré tel que le bacille soit apte à nos recherches. L'injection de 1/7 - 1/6 de culture sur gélose âgée de 24 heures, dans le péritoine de cobayes de 300 - 400 grammes, les tuait à coup sûr en 8-12 heures. Nous avons choisi comme virus de contrôle la dose d'un tiers de culture, c'est-à-dire la dose deux fois sûrement mortelle.

Injectée à un cobaye, cette dose ne provoquait presque aucune trace ni de leucocytose, ni de phagocytose : les animaux succombaient à la septicémie typhique expérimentale, à la généralisation des microbes, qui pouvaient être *toujours* retrouvés en nombre variable dans le sang. À l'autopsie, c'était toujours le tableau bien connu de la péritonite typhique : hyperémie de la paroi abdominale, des anses de l'intestin grêle, de l'estomac, des grands organes parenchymateux, des capsules surrénales ; quelques gouttes de liquide péritoneal, d'aspect grisâtre ou rougeâtre, qui ne renfermait que des masses de bacilles bien mobiles ; pas de fibrine à la surface du foie et de l'estomac.

Le milieu d'émulsion est d'une grande importance. Nous avons observé que l'eau physiologique et le bouillon, loin d'être indifférents envers les microbes, exercent *in vitro*, pendant la première demi-heure de l'émulsion, une action « bactéricide » des plus énergiques sur le bacille d'Éberth ; en effet, dans une goutte suspendue, on trouve au bout de ce temps une grande partie des microbes immobilisés. Cette action de l'eau physiologique est très prononcée, et c'est pourquoi ce liquide n'est pas à choisir pour des recherches délicates. Quant au bouillon peptonisé neutre, il conserve mieux la mobilité des bacilles ; mais au bout de quelque temps il présente une action bacté-

ricide passagère; aussi avons-nous toujours injecté l'émulsion aussitôt préparée.

La masse totale de l'injection est également de grande importance. L'injection d'une grande masse (8-10^{cc}) de bouillon facilite énormément le développement de la péritonite microbienne. Nous avons observé qu'un tiers, même un quart de la dose minima, émulsionné dans 10 c. c. de bouillon, tue parfaitement les cobayes, quand la même dose, additionnée d'1-2 c.c., est inoffensive pour les témoins. L'explication de ce fait un peu bizarre, qu'un virus moins concentré agirait plus énergiquement, est assez facile: dans ces cas-là les microbes trouvent dans le péritoine inondé de bouillon des conditions de développement très favorables; d'ailleurs le bouillon même, injecté à si grande dose, repousse nettement les phagocytes, et favorise ainsi l'infection. Eu égard à ces considérations, la masse totale de notre injection ne dépassait jamais 2-3 c. cubes.

Nous ajoutions notre sérum aussitôt après la préparation de l'émulsion, et nous l'injections de suite à des animaux de poids à peu près égal.

Les précautions décrites, quoique semblant peu importantes, sont d'une nécessité absolue pour le procédé de mensuration d'un sérum: en les observant rigoureusement, on n'a presque jamais de résultats irréguliers, comme c'est le cas quand on les néglige.

Après des injections du virus mélangé avec des doses différentes d'un sérum préventif, voici ce qu'on observe.

Virus et Sérum largement suffisant. — Après l'injection on observe l'agglutination des microbes, la phagolyse des cellules mononucléaires du péritoine, l'apparition de filaments fibrineux, qui finissent par précipiter les amas des microbes. Après 30, 50 minutes, on ne voit, dans le liquide retiré du péritoine à l'aide de pipettes Issaeff, que très peu d'éléments formés; une heure après l'inoculation commence l'apparition de phagocytes, qui englobent rapidement les rares microbes qui ont échappé à l'action agglutinante et précipitante du sérum. L'englobement de la plupart des microbes se fait dans la couche fibrineuse, qui, en enveloppant les bacilles, les fixe aux lames du péritoine. Si la dose de sérum était suffisante, les microbes ne réapparaissent plus après la première attaque des leucocytes. La température de l'animal,

qui s'est abaissée jusqu'à 36° (pas plus !) commence à remonter et dépasse bientôt la température normale.

16-20 heures après l'inoculation, le thermomètre monte à peu près à 40 degrés ; quant au péritoine, on n'y trouve presque pas de microbes : il n'y a que des polynucléaires et un grand nombre de mononucléaires macrophages, qui remplissent la goutte retirée, d'apparence louche, crèmeuse, blanchâtre. La plupart des polynucléaires sont vides, ils ne montrent que très rarement quelques microbes d'allure dégénérée ; les mononucléaires en contiennent encore quelques-uns d'aspect normal. Malgré cela, la disparition totale des microbes ne se fait que lentement : nous avons eu l'occasion de les mettre en évidence par des cultures sur gélose 2, même 3 jours après la guérison « microscopique » ; 24-38 heures après l'inoculation, la relation entre le nombre des polynucléaires et des mononucléaires macrophages correspond nettement à la dose du sérum employé : plus la guérison était rapide, plus il y a de macrophages.

Virus et Sérum insuffisant. — La différence réside dans le degré de l'activité phagocytaire, dans la réaction insuffisante de l'organisme. La goutte retirée du péritoine révèle, les premières heures déjà, le pronostic défavorable ; en effet, malgré une phagocytose quelquefois des plus accentuées, nous voyons toujours la persistance des microbes libres, non englobés. Les animaux présentant après 4-6 heures beaucoup de microbes libres périront à coup sûr.

La mort, dans ces cas où le sérum retarde visiblement l'infection, ne survient qu'au bout de 20-30 heures, même plus tard : rappelons que les animaux de contrôle périssent en 8-12 heures. Le tableau de l'autopsie est le suivant : pas d'injection des intestins, des parois ; les organes, les capsules pâles, le foie et l'estomac enveloppés de fausses membranes dont l'épaisseur varie entre 1/2-2 millimètres. On trouve un épanchement péritonéal toujours abondant, de 3-10 c. c., tantôt visqueux, jaunâtre, tantôt plus liquide, mais troublé de flocons fibrineux. Ces flocons renferment toujours un nombre immense de phagocytes bourrés de bacilles. Nous remarquions assez fréquemment la présence de granulations bien colorables dans ces leucocytes — c'est alors un curieux spectacle de ne voir que des bacilles en dehors des cellules, et les cellules elles-mêmes

remplies de boules. Dans les cas où le sérum est largement suffisant, les bacilles disparaissent très vite de l'intérieur des cellules, sans subir de changement de forme : nous sommes d'accord avec l'opinion émise par MM. Metchnikoff, Bordet, Cantacuzène, et nous considérons ces granules de Pfeiffer comme des microbes encore vivants pour la plupart, qui en se contractant offrent aux influences nocives la surface la plus petite possible. Ces granules, nous les avons retrouvés toujours en grande quantité dans les couches de fibrine qui enveloppent le foie et l'estomac, où ils prennent place dans des phagocytes d'aspect modifié. En les colorant avec une vieille solution de bleu de méthylène, les noyaux prennent une couleur violet pâle, et présentent des prolongements dilacérés, criblés de petites impressions, dont le centre est occupé par une ou plusieurs granulations.

Dans ces cas les microbes restent localisés au péritoine ; dans le sang on ne les met que rarement en évidence.

On peut observer tous les états transitoires depuis cette mort retardée, jusqu'à la guérison parfaite. Ainsi nous avons eu des cas où, 24-32 heures après l'inoculation, l'animal ne paraissait nullement malade : l'exsudat péritonéal ne renfermait que des macrophages, et les phagocytes ne se révélaient que par leurs noyaux, qui se présentaient sous la forme de pointes bleu verdâtre dans l'intérieur des mononucléaires. C'est avec la plus grande peine que nous découvrions quelques rares bacilles dans les préparations colorées, la culture n'en donnait pas plus d'une dizaine de colonies — et malgré cela, un ou deux jours après, les microbes réapparaissaient dans l'exsudat. Or les préparations démontrent que, dans ces cas, c'est une nouvelle génération de microbes qui pousse dans les cellules mononucléaires, douées de propriétés microbicides peu énergiques, et qui, après leur destruction, ne manque pas de tuer l'animal.

Dans d'autres cas la maladie, due à cette nouvelle poussée, ne fut mortelle qu'au bout de 5-6 jours : les animaux ont alors succombé à une péritonite chronique, qui se manifestait par une sorte de cachexie des plus accentuées. Au cours de cette intoxication chronique, le nombre des bacilles dans l'exsudat péritonéal reste toujours restreint, il n'y a pas lieu à une généralisation des bacilles d'Eberth ; au contraire, le sang renferme le plus fréquemment d'autres espèces, qui ont envahi l'animal.

Cette série de faits montre les difficultés qui surgissent quelquefois dans le titrage d'un sérum de valeur peu prononcée. En effet, la détermination de la valeur immunisante n'est pas une opération semblable aux expériences chimiques, au cours desquelles nous déterminons par une réaction nette la quantité d'un corps dans un composé chimique. C'est un ensemble de signes peu précis qu'il faut interpréter dans nos expériences. Quelquefois même, les limites étaient si indécises, qu'il nous a fallu 2-3 fois répéter la série des inoculations, pour arriver à un résultat certain.

Dans nos expériences, nous avons pris pour titre préventif la quantité minima d'un sérum, qui, additionnée à la dose du virus deux fois sûrement mortelle, la rend inoffensive pour l'animal. Dans des rares cas, nous avons accepté comme étant de valeur immunisante la dose d'un sérum qui, tout en faisant disparaître les microbes, n'a pas empêché l'intoxication chronique de l'animal.

I. *Développement du pouvoir préventif du sérum.*

Parlons d'abord du pouvoir préventif (anti-infectieux) du sérum des cobayes neufs. Parmi une dizaine d'animaux, nous n'en avons rencontré qu'un dont le sérum était actif contre le virus 3 fois mortel à la dose d'un c. c.; deux, dont le titre préventif était de 2 c. c.; la dose préventive des autres animaux surpassait 3-5 c. c.

Pour le virus 2 fois mortel (1/3 de culture), la valeur anti-typhique variait entre 1-2 c. c. Retenons ce chiffre comme point de départ de nos recherches.

Un jour après l'inoculation, le sérum ne montre pas de propriétés préventives : dans le cas examiné, il possédait le titre de 2 c. c.

2^e jour. Valeur normale : 1 c. c.

3^e jour. Deux cobayes. Le sérum du premier était nettement préventif à 1 c. c.; le sérum de l'autre était plutôt favorisant : les animaux qui le recevaient ont succombé avant le témoin.

4^e jour. 4 cobayes. La valeur préventive ne surpassait pas chez l'un d'eux la valeur normale (1 c. c.); deux animaux, au

contraire, possèdent comme titre préventif : 0,50 c. c.; l'un même : 0,30 c. c. C'est donc au quatrième jour que nous constatons l'augmentation des corps préventifs dans le sérum.

6^e jour. 4 animaux. La valeur antityphique a monté dans tous les cas examinés. Nous notons les titres suivants : 0,30, 0,20, 0,10, 0,10 c. c.

7^e jour. 2 animaux de titre pareil : 0,20 et 0,10 c. c.

10^e, 12^e, 13^e jour. 3 animaux de la même valeur : 0,05 c. c. C'est le maximum du pouvoir préventif provoqué par une seule injection.

14^e jour. 2 animaux. Valeur : 0,10; 0,10 c. c. Commencement de la décroissance.

20^e jour. Un animal : 0,20 c. c. ne préserve plus.

22^e jour : 0,10 c. c.; 27^e jour : 0,15 c. c.

Le schéma de la valeur préventive pourrait se traduire par une courbe, dont l'ascension commence le 4^e jour (0,50), devient plus prononcée et plus rapide le 6^e jour (0,15-0,10), atteint le maximum (0,10-0,05) le 10-12^e jour, pour rester quelques jours à cette hauteur, puis pour descendre lentement. Le développement de la plus grande partie des anticorps se fait vers le 6^e jour.

Ce schéma résume 22 cas bien observés; quelquefois pourtant, le développement de la valeur antityphique n'est pas en accord avec la courbe donnée. Nous avons séparé trois cas. Dans le premier, il s'agit d'un animal dont le sérum, 5 jours après l'injection, nous présentait déjà une valeur de 0,05 c. c.; les sérums de deux autres animaux, quoique examinés le 10^e et le 11^e jour, nous ont donné comme titre préventif le chiffre de 0,20 et 0,50 c. c. Retenons qu'il y a, dans la formation des anticorps, un individualisme qu'il est bon de se rappeler.

Nous avons également rayé de notre tableau le titre de 3 animaux, lesquels ont été inoculés avec un virus 3 fois mortel (2/5-1/2 culture). Nous avons pu très bien observer la grande influence de la quantité du virus sur le titre préventif : en effet, le 6^e jour, au lieu de 0,20-0,40 c. c., nous notons 0,80 c. c.; le 9^e et le 10^e jour, au lieu de 0,10-0,05 c. c., nous avons évalué le titre de 0,30 et 0,20 c. c. Une légère augmentation du virus nous donne un abaissement considérable du titre.

Ces chiffres se rapportent à des injections immunisantes

intrapéritonéales ; quant aux injections sous-cutanées de cultures typhiques, nous les avons abandonnées complètement. En effet, la culture injectée provoque toujours une nécrose considérable de la peau, à la suite de laquelle nos animaux ont succombé. Après quelques essais, nous avons pourtant réussi à éviter les nécroses de la peau en injectant notre culture divisée en plusieurs endroits du corps. Mais alors les corps préventifs ne se formaient que très faiblement. Par exemple, l'un de nos animaux ne présentait le 4^e jour dans son sérum aucun pouvoir préventif ; un deuxième (le 6^e jour) n'a pas surpassé la valeur d'un c. c. ; le troisième (le 7^e jour) a donné la valeur de 0,30 c. c.

II. *Valeur préventive des organes.*

Pour mettre en évidence les anticorps des organes, on se sert d'une méthode que nous employons chaque jour pour faire apparaître les diastases des cellules en général, celle de l'extraction de la cellule mécaniquement détruite.

Après avoir fait saigner à blanc les animaux, nous leur enlevons aussi vite que possible les organes à examiner, nous les pesons exactement, puis nous les broyons bien dans un mortier, tantôt tout simplement, tantôt à l'aide de sable quartzeux stérilisé. Ceci fait, quand le jus ainsi obtenu ne présente sous le microscope que quelques noyaux, qui résistent plus longtemps, nous y ajoutons du bouillon stérile. Nous mettons l'extrait ainsi préparé dans la glacière pendant 24 heures : au bout de ce temps, les débris cellulaires gagnent le fond et l'extrait s'éclaircit. On opère avec ces extraits comme avec le sérum. Pour comparer le suc d'organes au sérum, nous les injectons toujours en même temps, sans oublier un témoin, qui reçoit le virus non additionné de suc d'organes ou de sérum.

Parmi les organes examinés, nous citons : le foie, les capsules surrénales, le tissu de l'épipoon, la rate, la moelle des os, l'exsudat péritonéal. Disons d'abord que les organes des animaux normaux, même à une dose de 1 gr., ne manifestent aucun pouvoir préventif ni agglutinatif vis-à-vis du bacille typhique.

1. Les résultats relatifs au foie, à l'épiploon, aux capsules sur-rénales ont été nettement négatifs. Dans aucun cas, le pouvoir antityphique de ces organes ne surpassait celui du sérum : dans la plupart des cas, ce n'est qu'avec la plus grande peine que nous avons réussi à y découvrir des traces des anticorps.

2. Quant à l'ersudat péritonéal, au début de nos recherches, nous pensions que les anticorps se formaient dans les cellules mononucléaires macrophages de l'ersudat, qui englobent une grande partie des polynucléaires remplis des bacilles injectés, et que M. Gruber considérait déjà comme les fournisseurs des anticorps. Le tableau suivant nous renseigne sur cette hypothèse.

TABLEAU COMPARATIF DES VALEURS PRÉVENTIVES DU SÉRUM ET DE L'EXSUDAT

N°.	Marque de l'animal.	Jour.	Sérum.	Exsudat.	Notes.
1	II	2	1,00	(> 0,10)*	
2	45	3	(> 2,00)	(> 0,20)	
3	III	4	0,50	(> 0,04)	
4	39	4	0,30	(> 0,30)	
5	77	6	0,30	(> 0,30)	
6	190	6	0,10	0,30	
7	190/2	6	0,40	(> 0,20)	Exs > $\frac{\text{Ser}}{2}$
8	35	7	0,20	0,75	
9	27	7	0,10	(< 0,20)	
10	21	10	0,05	(> 0,30)	
11	66	12	0,03	(> 0,05)	
12	31	13	0,03	0,20	
13	32	14	0,40	0,40	Exs = Ser
14	34	14	0,10	(> 0,03)	
15	41	22	0,10	0,10	Exs = Ser
16	41/a	27	0,15	(> 0,30)	
Cas réguliers.	17	3	0,05	0,40	Exs = $\frac{\text{Ser}}{2}$
	18	27/a	10	0,20	(> 0,10)
	19	8/30	41	0,50	(> 0,30)
Virus mortel.	20	2	6	0,80	(> 0,05)
	21	75	9	0,20	(> 0,70)
	22	83	41	0,30	(> 0,30)
23	A	7	0,30	(> 0,10)	Injection sous-cutanée.

* > (0,10) signifie que 0,10 c. c. ne préservait nullement (nous n'avions plus d'ersudat à notre disposition).

Dans 23 cas, nous avons comparé l'exsudat avec le sérum. Dans 4 cas, la quantité totale de l'exsudat, qui était à notre disposition, fut trop petite pour en tirer des conclusions (n°s 1, 2, 3, 20); dans 19 cas, l'exsudat était de valeur beaucoup inférieure à celle du sérum; enfin, dans 4 cas, l'exsudat renfermait presque autant d'anticorps que le sérum (n°s 7, 13, 15, 17.)

Résultat : *négatif. Les anticorps ne se forment pas au niveau de l'injection faite.*

TABLEAU COMPARATIF DES VALEURS PRÉVENTIVES DU SÉRUM ET DE LA MOELLE DES OS

Nos.	Marque de l'animal.	Jour.	Sérum.	Moelle.	Notes.
1	56	3	1,00	(> 0,25)	
2	45	3	(> 2,00)	(> 0,15)	
3	39	4	0,30	(> 0,30)	
4	II a	6	0,20	(< 0,10)	M > S
5	77	6	0,30	(> 0,15)	
6	190/2	6	0,10	(> 0,15)	
7	35	7	0,20	(> 0,20)	
8	27	7	0,40	(> 0,20)	
9	21	10	0,05	(> 0,10)	
10	66	12	0,05	0,10	M = $\frac{S}{2}$
11	31	13	0,05	(> 0,20)	
12	32	14	0,10	(> 0,20)	
13	34	14	0,40	(> 0,15)	
14	41	22	0,10	0,10	M = S
15	41/a	27	0,15	(> 0,10)	
Cas irréguliers.	16	3	0,05	(> 0,10)	
	17	27 a	10	0,20	M = S
Virus fois mortel.	18	78/30	11	0,50	(> 0,20) M = S
	19	2	0,80	(> 0,20)	
	20	95	9	0,20	(> 0,20)
	21	83	11	0,30	(> 0,25)
22	A	7	0,30	(> 0,10)	Injection sous-cutanée.

* Servie de plusieurs jours. La moelle peut être considérée comme équivalente au sérum.

Nos recherches comparatives se rapportent à 22 cas examinés. Dans 5 cas (1, 2, 11, 19, 22), la quantité de la moelle était trop petite pour permettre une détermination exacte de la valeur préventive; dans 12 cas, la moelle agit sûrement plus faiblement que le sérum. Dans un cas (10), la moelle renfermait la

moitié des anticorps du sérum; dans 3 cas (14, 17, 18), moelle et sérum étaient également actifs; enfin, nous avons un animal (4) dont la moelle était plus efficace.

Il s'agit d'un cobaye au 6^e jour de son immunisation, c'est-à-dire, justement au temps de la formation des anticorps. Le titre du sérum était de 0,20, tandis que 0,40 de la moelle était déjà actif; *la moelle semble donc être un des organes dans lesquels les anticorps typhiques se forment*. Mais ce n'est pas démontré pour tous les cas.

La rate. — Remarquons d'abord que c'est à la rate que MM. Pfeiffer et Marx ont attribué le rôle le plus important dans la formation des corps anticholériques. Notre attention une fois éveillée, c'est avec le plus grand soin que nous avons essayé d'étudier le rôle de cet organe au cours de l'immunisation.

Le tableau suivant contient les titres comparatifs de 30 cas.

TABLEAU COMPARATIF DES VALEURS PRÉVENTIVES DU SÉRUM ET DE
LA RATE

Nos.	Marque de l'animal.	Jour	Sérum.	Rate.	Notes.
1	I	1	2,00	(> 0,50)	
2	II	2	4,00	(> 1,00)	
3	50	3	1,00	(> 0,50)	
4	45	3	(> 2,00)	(> 0,50)	
5	I a	4	1,00	(> 0,65)	
6	III	4	0,50	(> 0,30)	
7	F	4	0,50	(> 0,50)	
8	39	4	0,30	0,30	R = S
9	II a	6	0,20	0,40	R > S
10	77	6	0,30	0,15	R > S
11	190	6	0,10	0,40	R = S
12	190/2	6	0,40	0,05	R > S
13	35	7	0,20	(> 0,30)	
14	27	7	0,40	(> 0,20)	
15	21	10	0,05	0,20	
16	66	12	0,05	0,15	
17	31	13	0,05	0,05	R = S
18	32	14	0,10	(> 0,20)	
19	34	14	0,10	0,40	R = S
20	41	22	0,40	(> 0,20)	
21	41/a	27	0,15	0,40	R > S
22	3	5	0,05	(> 0,30)	
cas irréguliers.	23	27 a	9	0,20	$R = \frac{2}{3} S$
	24	78/30	11	0,50	(> 0,40)

Virus 3 fois mortel.	25	2	6	0,80	(> 0,30)
	26	75	9	0,20	(> 0,40)
	27	83	44	0,30	(> 0,20)
Injections sous- cutanées.	28	B	4	(< 0,50)	(> 0,50)
	29	G	6	0,80	(> 0,80)
	30	A	7	0,30	0,30
					R = S

Examinons ces 30 cas. Nous en rayerons d'abord 9 cas, où la comparaison n'était pas possible (1, 3, 4, 5, 6, 24, 25, 27, 28) à cause de la quantité insuffisante de l'organe qui était à notre disposition. Il reste 21 cas; chez 11 animaux la rate renfermait moins d'anticorps que le sérum. Au contraire, la rate était dans 6 cas de même valeur que le sérum (8, 11, 17, 19, 23, 30), dans 4 cas (9, 10, 12, 21), elle était plus efficace.

De ces 10 cas où la rate était plus préventive que le sang, 7 se rattachent à la période de formation (4-9^e jour), les 3 autres sont de la période ultérieure (13, 14, 17^e jour). Résultat : Nous avons réussi à reconnaître dans la rate un deuxième foyer des anticorps typhiques, qui s'y trouvent dans la moitié des cas en plus grande quantité que dans le sang.

Pour envisager le rôle de la rate, nous avons essayé d'immuniser des animaux splénectomisés.

Rappelons que les cobayes supportent bien la splénectomie. L'opération faite aseptiquement, il n'y a qu'un danger à craindre, c'est la perte du sang, à laquelle on obvie facilement par la ligature du hile de la rate. Pourtant, au début de nos expériences, nous avons perdu un grand nombre d'animaux le 7-9^e jour après l'opération. C'était toujours une péritonite due à un petit bacille coliforme, extrêmement virulent pour le cobaye; nous croyons que l'origine de cette péritonite est à chercher dans un peu de tissu de la rate resté en place, qui renfermait peut-être des bacilles de provenance intestinale, englobés bien entendu, et qui après la mort des phagocytes envahissaient l'organisme. Quoi qu'il en soit, les plus petites traces de la rate une fois enlevées, les animaux n'ont plus succombé.

Nous observions pendant plusieurs semaines les cobayes dératés, et quand ils avaient regagné leur poids initial, nous leur injections notre dose d'une culture chauffée, pour les immuniser. Mais les premiers essais nous ont convaincu que cette méthode d'immunisation n'aboutit pas. Une intoxication des plus aiguës intervient toujours, et les animaux succombent à un collapsus

foudroyant, à une chute brusque de température. Nous avons observé au cours des trois premières heures un abaissement de température de 7°, dans un deuxième cas de 9°, etc., etc. Quelquefois l'injection d'une culture entière ne tuait pas les animaux par intoxication, mais par une infection secondaire : nous avons trouvé alors les bords de la suture congestionnés, livides, et infectés par des streptocoques, qui, étant enkystés dans des vieux petits abcès, ont évidemment regagné leur virulence au cours de l'intoxication. Les animaux dératés étaient très sensibles envers le poison des bacilles typhiques chauffés, mais nous avons vu qu'il s'agit dans ces cas tout simplement d'un affaiblissement de résistance consécutif à l'opération. Après quelques tâtonnements, nous avons réussi parfaitement à immuniser nos animaux dératés, en leur injectant notre dose immunisante divisée en deux parties égales dans l'espace de 24 heures. La dose d'une demi-culture chauffée ne provoquait pas d'intoxication.

Nous disposons de 5 cas pareils. En considération du fait que le maximum du pouvoir antityphique apparaît vers le 8-11^e jour, nous avons recherché si, dans cette période, il y a une diminution du pouvoir préventif chez les dératés.

Le tableau suivant donne les valeurs préventives du sérum et de la moelle des os.

TABLEAU DES ANIMAUX DÉRATÉS

Nos.	Marque.	Dératé depuis.	DOSE de culture reçue.	Immunisé depuis.	Titre du sérum.	Titre de la moelle.	NOTES
1	D 21	26 jours.	{ 19/IV 1/2 cult. 20/IV 1/2 cult.	8 jours.	0,30	0,30	
2	D 1	27 jours.	{ 27/III 1/2 cult. 28/III 1/2 cult.	8 jours.	0,20	> 0,20*	* Une survie de plusieurs jours. Titre limite.
3	D 28	24 jours.	{ 25/IV 1/2 cult. 26/IV 1/2 cult.	10 jours.	0,10	0,25	
4	D 7	22 jours.	{ 25/III 1/2 cult. 26/III 1/2 cult.	11 jours.	0,40	(> 0,30)	
5	D 24	26 jours.	{ 19/IV 1/2 cult. 20/IV 1/2 cult.	12 jours.	0,05	0,05	

Les valeurs préventives du sérum correspondent absolument à celles des non dératés. Quant aux organes, dans deux cas le titre de la moelle était supérieur à celui du sang (1-5), dans un cas les deux valeurs étaient presque égales (2), dans deux cas la moelle était moins préventive (3-4).

Le résultat de ces expériences n'était pas douteux : *Le développement du pouvoir antityphique du sérum se fait chez les animaux dératés aussi bien que chez les non dératés.*

Les résultats de la splénectomie ont élucidé en partie le problème : d'autre part ils nous ont posé des nouvelles questions. Les anticorps se forment évidemment dans plusieurs organes. Concluons que ce sont surtout la rate et la moelle qui prêtent leur concours à l'organisme pour la fabrication des anticorps typhiques, c'est-à-dire les mêmes organes auxquels MM. Pfeiffer et Marx attribuent un grand rôle dans la fabrication des anticorps cholériques. Ces organes se suppléent : si nous enlevons la rate, le développement des anticorps se fait par les autres organes.

Comment ces organes forment-ils les anticorps ? La spécificité des anticorps nous indique évidemment que ce sont certaines parties du protoplasme microbien qui excitent les cellules vivantes de l'organisme à la production des anticorps. Or, la question qui se pose est celle-ci : les produits microbiens qui donnent l'impulsion à l'activité formatrice cellulaire se trouvent-ils fixés aux organes qui les transforment, ou bien sont-ils dissous dans les humeurs, et ne se transforment-ils qu'en se rencontrant dans la circulation avec les mêmes cellules ?

Pour résoudre cette importante question, nous nous adressons également à la splénectomie. En effet, si les produits intermédiaires entre les produits bactériens et les anticorps, ces substances hypothétiques que nous désignerons comme « substances immunogènes ou antigènes », se trouvent fixés dans la rate, enlevant cet organe formateur vers le 4-5^e jour après l'immunisation, c'est-à-dire avant l'apparition des anticorps, nous changerons sensiblement le cours de l'immunisation.

Nous possédons 6 cas pareils dont l'examen nous donne le tableau suivant :

TABLEAU DES ANIMAUX IMMUNISÉS PUIS DÉRATÉS

Nos	Marque.	Immunisé.	Dératé après	Examen après	Titre du sérum.	Titre de la moelle.	NOTES
1	A 20	29/III	3 jours.	7 jours.	0,50	0,50	
2	A 26	3/IV	3 jours.	8 jours.	0,30	0,25	
3	A 23	31/III	3 jours.	13 jours.	0,10	0,20	
4	A 24	4/IV	5 jours.	10 jours.	0,50	(> 0,40) **	Péritonite.
5	A 44	27/III	5 jours.	11 jours.	0,20	0,20	
6	A 32	22/IV	5 jours.	11 jours.	0,50 *	(> 0,40) **	* 0,30 était sans aucun effet.

** Titre indéterminable; toute la quantité de la moelle dont nous disposions était inefficace.

Chez les animaux dératés le 3^e jour de l'immunisation, il y a déjà une diminution assez sensible (n° 1-2); chez les animaux dératés le 5^e jour, cette diminution est très forte. Les deux cas 4 et 6 ne renferment, quoique immunisés depuis le 10^e et le 11^e jour, que très peu d'anticorps; la diminution chez l'animal n° 5 n'est pas si sensible.

En somme la splénectomie, faite 3-5 jours après l'injection immunisante, occasionne, dans une partie des cas, une dépression considérable du pouvoir préventif; ce qui prouve que le cinquième jour une partie des produits « immunogènes » est déjà fixée dans la rate.

Nous remarquons que dans trois cas (2, 3, 5), l'abaissement n'est pas évident: or, la valeur de la rate en substances immunogènes doit être assez variable. Quels organes prennent part dans ces cas à la formation des anticorps? Dans trois cas la moelle renfermait moins d'anticorps. (On voit qu'au moins un tiers des cas reste toujours sans explication).

Le rôle fixateur de la rate étant reconnu, nous nous sommes demandé s'il n'était pas possible de mettre directement en évidence les substances antigènes fixées. La question peut être ainsi posée : Quel est le sort des produits microbiens injectés?

Le sort des microbes morts injectés n'est pas à élucider à l'aide du microscope. Comme nous l'avons déjà exposé, 48 heures après l'injection des microbes *vivants*¹, les phagocytes, qui ont englobé les microbes, sont eux-mêmes englobés et détruits par les macrophages mononucléaires, de sorte que le troisième jour il n'y a que des traces des polynucléaires. *A fortiori* nous affirmons que les produits renfermant les corps microbiens digérés et dissous prennent place également dans les macrophages. Ces cellules disparaissent de la surface du péritoine vers le quatrième jour, et c'est justement le quatrième, cinquième jour qui marque la première apparition des anticorps typhiques chez le cobaye. Nous supposons que ces macrophages, chargés de produits microbiens, finissaient par arriver dans les organes lymphoïdes, dont nous avons appris à connaître les relations avec les anticorps. Il n'y a pas de moyen de reconnaître ces mononucléaires dans la rate, puisqu'ils sont absolument semblables aux cellules endothéliales spléniques fixes. Mais nous avons imaginé un procédé qui les met bien en évidence. En effet, en injectant du suc d'un organe chargé de produits typhiques à un deuxième animal, le sérum de celui-ci acquerra au bout de 8-10 jours des propriétés agglutinantes envers le bacille d'Eberth. Nous nous sommes servi de cette méthode de l'agglutination « diagnostique » pour étudier la question.

Dans 7 cas, nous avons injecté dans la cavité péritonéale des cobayes des rates extirpées entre le 3^e et le 5^e jour après l'injection immunisante. Dans notre première expérience, une péritonite foudroyante, avec un petit para-colibacille dont nous avons parlé, a tué l'animal en quelques heures. Désormais, pour éviter cet accident, nous provoquons par des injections de bouillon une forte hyperleucocytose péritonéale, qui conférait aux animaux une résistance considérable à l'égard des microbes introduits avec la rate broyée. Remarquons que le sérum des cobayes choisis ne présentait qu'un pouvoir agglutinant faible : sa valeur ne surpassait pas la dilution de 1 : 5.

Il nous reste 6 cas observés. Au bout de 7 jours le sérum de 3 des cobayes — injectés avec des rates du cinquième jour —

1. Les microbes vivants sont plus aptes à cette sorte de recherche que les microbes chauffés qui, ayant perdu leur colorabilité, sont difficiles à retrouver dans les phagocytes.

agglutinait sensiblement : ce pouvoir agglutinant dans deux cas ne surpassait pas le 1/20, une fois il était de 1/30. Dans trois cas, les rates n'ont pas provoqué l'agglutination dans le sérum. Le suc des rates extirpées n'agglutinait, bien entendu, jamais que très faiblement (1 : 3) le bacille typhique.

Par la méthode de l'agglutination diagnostique, nous avons réussi à démontrer directement la présence de substances typhiques dans les rates des animaux immunisés ; ainsi ces expériences peuvent être considérées comme la contre-épreuve des expériences relatives à l'influence de la splénectomie tardive sur le cours de l'immunisation.

Malgré ces données, les résultats n'étaient pas encore suffisamment clairs. En effet, dans la moitié des cas, l'injection des rates restait sans effet; d'autre part, le degré faible de l'agglutination, dans les trois cas où elle se produisait, nous a démontré que la rate ne peut être considérée comme un filtre absolu, qui retiendrait toutes les cellules chargées de produits microbiens. Une grande partie des produits antigènes doit se trouver ailleurs. Cela nous a conduit à entreprendre de nouvelles recherches.

Dans ce but nous nous sommes adressé à un cobaye immunisé depuis quatre jours ; l'animal en question fut saigné à blanc, puis nous lui avons extirpé le foie et la rate. D'un lot de quatre animaux neufs, le premier a reçu dans le péritoine l'extrait de trois grammes de foie, le deuxième la rate entière broyée, le troisième tout le sérum, 12 c. c., le quatrième, 10 c. c. d'un sérum préventif et agglutinant jusqu'à la dilution de 1 : 300. Ce quatrième animal nous a servi comme témoin. Huit jours après, les valeurs agglutinantes de ces animaux se présentèrent ainsi :

Organes	I. Animal « Foie »	1 : 5	Agglutination normale.
du	II. Animal « Rate »	1 : 20	Légère élévation. } Agglut.
4 ^e jour.	III. Animal « Sérum non aggl. ».	1 : 300	Brusque élévation. } active.
Témoin.	IV. Animal « Sérum aggl. »....	4 : 30	Descente. } Agglut, passive,

Au bout de 8 jours, les agglutinines injectées avec le sérum préventif témoin ont en grande partie quitté l'animal IV; au contraire le sérum *non* agglutinant provoquait chez le deuxième animal III la formation d'agglutinines de haute valeur. Dans ce

cas c'était une *immunité active produite par un sérum non préventif, mais par contre chargé de produits microbiens.*

Cette expérience nous démontre nettement qu'en effet une grande partie de la culture injectée passe dès les premiers jours dans le sang.

Nous avons renouvelé cette expérience dans *cinq cas*. Deux fois nous avons eu, à l'aide de 10 c. c. de sérums du 3^e jour, des valeurs agglutinantes de 1 : 40, et 1 : 50 ; une fois la valeur de 1 : 20 ; dans deux cas, par contre, l'injection de 5 c. c. de sérum du 2^e jour ne provoqua pas l'agglutination secondaire.

Ces deux cas peuvent-ils anéantir nos résultats antérieurs ? Non. Nous avons déjà observé dans le laboratoire de M. Gruber que la valeur agglutinante d'un sérum n'observe pas un strict parallélisme avec la masse de la culture injectée. Au contraire, en injectant des quantités inférieures à 1/6-1/10 de culture chauffée, l'injection ne provoque plus la formation des agglutinines. De même les 2 cas mentionnés ne prouvent pas l'absence des produits dans les rates injectées ; peut être les organes en question en renfermaient-ils des quantités trop faibles pour donner naissance à des agglutinines en quantité appréciable.

Néanmoins la présence des produits typhiques dans le sang est indubitable. Cela concorde d'ailleurs avec des faits analogues déjà signalés. En effet, au début de l'immunisation antidiphétique, on retrouve les toxines injectées dans le sang des animaux, et d'après une communication orale de M. Batzaroff, on observe également, au début de l'immunisation antipesteuse, que la toxine pesteuse existe pendant quelques jours dans le sérum des cobayes immunisés. Quand il s'agit, — comme dans ces cas — de toxines assez puissantes, on les met facilement en évidence en injectant le sérum à des petits animaux sensibles auxdites toxines : pour les produits typhiques peu toxiques, la démonstration ne fut possible que par la méthode décrite d'agglutination diagnostique.

En somme, tous les phénomènes se rapportant à la formation des anticorps sont caractérisés par une variabilité considérable. La valeur préventive des organes nous indique certainement que, dans une grande partie des cas, les corps préventifs se forment dans la rate et dans la moelle, mais elle ne nous indique pas quelles sont les cellules qui les fabriquent.

La question n'est pas résolue. Cependant, si l'on tient compte que : 1^o dans une moitié des cas c'est le sang qui renferme le plus d'anticorps ; 2^o la splénectomie tardive est dans la moitié des cas sans influence sur la valeur préventive du sérum ; 3^o assez souvent la rate ne contient que peu de substances antigéniques ; 4^o enfin ces dernières se trouvent assez fréquemment dans le sang même, de toute cette variabilité des phénomènes nous pouvons conclure qu'il n'y a pas d'organe formateur, il n'y a que des endroits de formation. Ces endroits n'ont qu'un signe caractéristique de commun, c'est leur teneur en leucocytes. En effet, en supposant avec M. Metchnikoff que ce sont les cellules leucocytaires — nous pensons : les mononucléaires — qui, chargées de produits typhiques, quittent le point d'infection pour se rendre soit dans le sang, soit dans la rate, soit dans les autres organes lymphoïdes, pour fabriquer les anticorps dans les organes où on les trouve en plus grande quantité, nous comprendrons tous les faits précités. En broyant la rate et la moelle, nous n'avons fait qu'extraire les anticorps des nombreux mononucléaires que ces organes renferment ; en injectant cet organe tritiqué, nous injectons en réalité ses leucocytes ; enfin, en enlevant la rate d'un animal au début de son immunisation, nous le privons d'une grande quantité de mononucléaires chargés de produits antigéniques.

Jusqu'à preuve du contraire, il nous semble que cette hypothèse est la seule plausible. Dès lors, voici nos conclusions :

1.) Une seule injection intraperitoneale d'une culture typhique provoque la formation des anticorps chez les cobayes ;

2.) Le pouvoir antityphique apparaît dans le sérum vers le 4^e-5^e jour, va en augmentant pour atteindre son maximum vers le 11^e-12^e jour (0,05 c. c. préservant contre un virus deux fois mortel). Il diminue alors, mais il peut être mis en évidence encore un mois après l'injection ;

3.) Le pouvoir antityphique est peu considérable dans le foie, le rein, les capsules surrénales, l'épiploon. La valeur du pouvoir antityphique de l'excès d'urine péritonéale se rapproche quelquefois de celle du sérum, sans la surpasser jamais ;

4.) Dans 1/4-1/5 des cas, la moelle des os, et, dans la moitié des cas, la rate sont plus actives que le sérum ;

5.) Les organes lymphoïdes sont en relation avec la formation des anticorps ; mais assez souvent (1/3 des cas) ils ne pren-

nent nullement part à la formation des corps préventifs. Nous supposons qu'alors ces corps se forment ailleurs, peut-être dans le sang même;

6.) Le rôle des dits organes se démontre par les faits suivants :

α) Le développement du pouvoir antityphique chez les animaux dératés longtemps avant l'immunisation se fait tout comme chez les animaux neufs; dans la majorité de ces cas, la moelle des os est plus efficace que le sérum;

β) La splénectomie des animaux durant les premiers jours de leur immunisation est suivie par une diminution considérable du pouvoir antityphique; quelquefois cet effet de la splénectomie tardive n'est pas prononcé;

γ) L'injection des rates ainsi extirpées dans le péritoine d'autres cobayes provoque l'apparition des agglutinines spécifiques dans le sang de ceux-ci, ce qui prouve que des substances typhiques « antigènes » se trouvent fixées dans la rate;

δ) Une autre partie — variable — de l'injection immunisante, peut être également mise en évidence par la même méthode d'agglutination diagnostique dans le sang même des animaux récemment immunisés;

7.) Nos expériences ne montrent pas quelles sont les cellules formatrices : elles ne désignent que les endroits de formation des anticorps. Vu d'un côté le caractère lymphatique de ces endroits, (sang, rate, moelle), d'autre côté la grande variabilité des faits observés, nous supposons que ce sont des cellules migratrices d'origine leucocytaire qui, chargées de produits microbiens, y forment les anticorps préventifs.

II. PARTIE.

RECHERCHES SUR L'ORIGINE DES AGGLUTININES ET LEURS RELATIONS AVEC LES ANTICORPS.

1.) *Relations entre le pouvoir préventif et agglutinant.*

Parallèlement aux recherches relatives aux corps préventifs, nous avons déterminé le pouvoir agglutinant des sérums et des

organes. D'abord nous avons voulu déterminer, par un grand nombre de dosages exacts, les relations entre le pouvoir anti-infectieux et le pouvoir agglutinant d'un sérum.

Cette question n'est pas encore résolue, puisque actuellement nous ne pouvons isoler ni les anticorps, ni les agglutinines de leur mélange : toutes les tentatives de séparation des deux corps soit par le chauffage, soit par des agents chimiques, ont échoué.

Le sérum d'un malade typhique, le sérum d'un animal immunisé les contiennent en même temps ; ces sérums chauffés perdent ces deux dites qualités en même temps ; ensemencés avec le microbe correspondant il les perdent, — après un séjour dans l'étuve (Gruber) — parallèlement. Nous-même, nous avons vu, dans des recherches faites au printemps 1898 dans l'Institut hygiénique de M. Gruber à Vienne, qu'en faisant disparaître par un chauffage une partie du pouvoir agglutinant d'un sérum immunisant, nous avons privé en même temps le sérum d'une partie analogue de ses corps sensibilisateurs, c'est-à-dire qu'un sérum rendu peu agglutinant ne donne aux microbes qu'une faible sensibilité envers les influences bactéricides d'un sérum. Des pareilles expériences ont été publiées par M. Trumpp¹ à Munich.

De là nous pouvons en effet conclure que ces substances sont dans le sérum intimement liées l'une à l'autre, qu'elles sont douées des mêmes affinités pour les bactéries correspondantes, qu'enfin elles doivent être entraînées simultanément par les substances albuminoïdes du sérum précipitées par la chaleur. Or, malgré les présomptions assez grandes en faveur de l'identité des deux substances, cette identité n'est pas encore acceptée.

En effet, il n'y a qu'un seul moyen pour élucider cette question : c'est la comparaison de la valeur préventive et agglutinante de *differents* sérums, empruntés à des animaux différents et produits dans des conditions différentes. Des observations de ce genre ont été faites à ce sujet par MM. Pfeiffer et Kolle², Fraenkel et Otto³, qui ont conclu que le pouvoir agglutinant

1. TRUMPP : *Archiv fur Hygiene*, XXX, 1, 2.

2. PFEIFFER et KOLLE : *Centralblatt für Bakter.* 1896, XX, n°s 4 et 5.

3. FRAENKEL et OTTO : *Münchener med. Wochenschrift*, 1897, n° 39.

d'un sérum n'est nullement en relation avec son pouvoir anti-infectieux.

Nous nous sommes trouvés à l'Institut Pasteur dans les conditions les plus favorables pour pousser plus avant ces études.

a) *Développement du pouvoir agglutinant.* — Dans des recherches non encore publiées, que nous avons poursuivies dans le laboratoire de M. Gruber, nous avons déjà établi par des mensurations journalières, que 1^o une seule injection intrapéritonéale d'une culture chauffée typhique provoque déjà l'apparition des agglutinines dans le sérum des cobayes; 2^o le schéma du développement de l'agglutination peut être traduit par une courbe, dont l'ascension commence vers le 3^e ou 4^e jour, quelquefois même à la fin de la 2^e journée : elle atteint graduellement son maximum vers le 10^e ou 12^e jour, pour descendre ensuite lentement.

En continuant ces recherches sur des différents sérums à l'Institut Pasteur, nous n'avons que confirmé ces résultats. Les différents sérums présentaient dans les 4-5 premiers jours des titres agglutinants peu élevés : les sérums pris le 10^e ou 12^e jour possédaient pour la plupart un pouvoir agglutinant assez fort.

Disons d'abord quelques mots de notre méthode de titrage. Nous avons pris pour titre agglutinatif d'un liquide la dilution minima qui, dans la goutte suspendue, dans l'espace d'une heure, donne encore naissance à des petits amas nettement distincts d'au moins 10 à 15 individus microbiens. Cette méthode d'appréciation de la valeur agglutinante est selon nous préférable à cette autre méthode assez fréquemment employée, qui n'admet l'agglutination que quand elle est totale. En effet nous avons observé, dans des recherches faites antérieurement, que l'agglutination totale dépend beaucoup du nombre des microbes à agglutiner, car en rendant l'émulsion plus dense, il faut pour amener l'agglutination totale ajouter une plus grande quantité de sérum. De cette expérience il ressort que, les agglutinines se fixant aux corps microbiens, le pouvoir d'agglutination totale d'un sérum dépend en grande partie du nombre de microbes sur lesquels on le fait agir. Au contraire l'agglutination partielle, si nous avions soin d'exclure l'erreur qu'introduit le nombre des microbes en n'employant que des émulsions microbiennes très étendues, ne dépend que de la dilution du sérum.

Nos chiffres d'agglutination se rapportent toujours à la « dilution du sérum », et non à la relation entre les volumes de sérum et de culture. » En effet ces deux modes d'expression, quoique semblables, ne nous semblent pas être identiques. Il en est absolument de même pour l'action des substances antiseptiques sur le protoplasma microbien. On ne dit jamais : « une partie d'acide phénique tue 100 parties de telle culture, » mais bien : « l'acide phénique tue dans la dilution 1/0/0 tels microbes. » De même nous ne dirons jamais : « une goutte de sérum agglutine 100 gouttes de culture », mais, le « sérum dilué à 1/0/0 agglutine telle espèce de microbes ».

Voici notre méthode, que nous pratiquions toujours. Pour faire les dilutions : 5, 10, 20, 40, 60, nous préparons 5 verres de montre, dans lesquels nous déposons 4, 9, 19, 39, 59... parties de notre émulsion microbienne (15 c. c. de bouillon pour une culture sur gélose âgée de 16 heures) à l'aide d'une pipette capillaire, divisée en 1/500 c. c., nous ajoutons à chacun de ces verres avec la même pipette une partie de sérum, que nous mélangeons tout de suite en soufflant à la surface du mélange à travers la pipette; ceci fait nous laissons monter une petite colonne dans des tubes capillaires préparés dans ce but, nous en déposons une gouttelette sur la lamelle, que nous renversons sur la lame creuse, puis nous scellons les tubes capillaires, pour observer les modifications qui s'y passent. De cette façon-là nous pouvons observer les phénomènes macro et microscopiquement à divers moments de leur évolution. — Quand le titre d'un sérum surpassait 100, nous l'avons dilué d'abord à 1 : 20, et nous recommencions l'échelle.

Les dispositions exposées nous permettent d'établir à quel degré de dilution le sérum est encore agglutinant.

Le tableau suivant donne les titres d'agglutination déterminés dans le sérum de différents cobayes.

TABLEAU DES TITRES AGGLUTINANTS

Nos.	Marque.	Jour.	Titre.	Notes.
1	A 42	2	20	Valeur normale.
2	A 38	2	45	—
3	50	3	5	—
4	45	3	< 5	—
5*	39	4	200	Brusque élévation.

6	F	4	20	
7		3	5	40
8	A 43	5	100	
9	190	6	40	
10	190/2	6	160	
11	A 30	7	100	
12	35	7	150	
13	A 39	9	200	
14	A 4	10	300	
15	27 a	10	500	
16	21	10	1,500	
17*	78/30	11	150	Valeur exceptionnellement basse.
18	66	12	1,000	
19*	34	13	150	Valeur très basse.
20*	32	14	80	Valeur très basse.
21	34	14	1,000	
22	41	22	320	
23	41/a	27	400	

Les chiffres ci-dessus sont assez d'accord entre eux. Cependant les cas marqués d'un astérisque* offrent certaines particularités. Chez le n° 5 il y avait une apparition plus brusque du pouvoir agglutinant (notons que le sérum était en même temps exceptionnellement préventif); chez les 3 autres cobayes (n°s 17, 19, 20) le pouvoir agglutinant se perdait trop vite. L'un de ces trois animaux (n° 17) ne renfermait que peu de corps préventifs, *les deux autres montraient un pouvoir préventif bien actif.*

En général nous pouvons dire que la courbe du développement des agglutinines suit la même allure que celle des anticorps; nous n'avons trouvé que quelques rares (4 sur 23) exceptions à cette règle. Certaines circonstances individuelles inconnues chez les animaux font varier la quantité absolue des agglutinines dans leur sang.

b) *Relations entre les corps préventifs et agglutinants.* — Le tableau suivant nous donnera les résultats comparatifs du titrage parallèle de 27 animaux immunisés, soit des dératés avant ou pendant l'immunisation, soit des animaux normaux. Les résultats sont groupés selon la valeur du pouvoir préventif des sérum.

En examinant ces chiffres, nous voyons qu'il existe en effet un certain parallélisme entre les deux colonnes de chiffres; en comparant l'échelle des titres agglutinants moyens avec l'échelle des titres préventifs nous verrons le parallélisme très prononcé. Or, en général nous pouvons considérer les sérum les plus

agglutinants comme les plus riches en anticorps ; mais le parallélisme n'est pas assez strict pour qu'en visant *un* sérum spécialement dont nous connaissons le titre agglutinant, nous puissions prédire sa valeur préventive.

COMPARAISON DES TITRES PRÉVENTIFS ET AGGLUTINANTS

Nos	Marque.	Valeur préventive.	Titre agglut. moyen.	Titre agglut.	NOTES
1	3			40	
2	31			150	
3	D 24	0,05	640	500	Dératé au cours de l'immunisation.
4	66			1,000	
5	21			1,300	
6	190			40	
7	32			80	
8	41			320	
9	A 23	0,10	460	100	Dératé au cours de l'immunisation.
10	D 28			600	Dératé avant l'immunisation.
11	D 7			800	—
12	34			1,000	—
13	190/2	0,15	280	160	
14	11			400	
15	A 14			50	Dératé au cours de l'immunisation.
16	D 1	0,20	250	200	Dératé avant l'immunisation.
17	27 a			300	
18	A 26			30	Dératé au cours de l'immunisation.
19	D 21	0,30	100	80	Dératé avant l'immunisation.
20	39			200	
21	A 32			5	Dératé au cours de l'immunisation.
22	A 24			20	—
23	A 20	0,50	40	10	—
24	F			20	—
25	78/30			150	
26	50	1,00	5	5	
27	45	>2,00	<5	<5	

En composant notre tableau selon les valeurs agglutinantes, nous démontrerons nettement que la même valeur agglutinante peut dans les différents sérums correspondre à des valeurs préventives, qui entre elles présentent d'énormes différences.

TABLEAU COMPARATIF RANGÉ SELON LES VALEURS AGGLUTINANTES

Agglutination.	Force préventive.	Limites.
0 — 5	2,00, 1,00, 0,50	2,00 — 0,50
10 — 20	0,50, 0,50, 0,50	0,50
30 — 160	0,50, 0,30, 0,30, 0,20, 0,15, 0,10, 0,10, 0,05, 0,05	0,50 — 0,05 !
200 — 600	0,30, 0,20, 0,20, 0,15, 0,10, 0,10, 0,10, 0,05	0,30 — 0,05 !
800 — 4,500	0,10, 0,10, 0,05, 0,5	0,10 — 0,05

Un pouvoir agglutinant élevé correspond toujours à une valeur préventive forte, mais la valeur élevée préventive ne correspond pas toujours à une forte agglutination.

Le parallélisme entre le pouvoir préventif et agglutinant n'étant que superficiel, ne nous permet pas d'identifier les deux corps. Or, malgré la régularité de l'apparition du pouvoir agglutinant dans les sérums préventifs antityphiques, malgré la réaction, analogue et parallèle, des deux corps envers la chaleur et d'autres influences qui précipitent les substances albuminoïdes, malgré leur affinité parallèle pour les corps microbiens correspondants, en présence des résultats des titrages parallèles, nous pensons que l'idée de *l'unité de ces deux corps doit être définitivement abandonnée*.

L'étude des circonstances qui empêchent quelquefois la formation des agglutinines, tout en permettant la formation des corps préventifs, ne peut pas être faite. Dans la littérature nous ne trouvons qu'un mémoire qui pénètre un peu dans ces conditions de développement séparé des deux pouvoirs, c'est le travail de MM. Fränkel et Otto. Ces savants ont observé qu'après ingestion de grandes masses de cultures typhiques par le chien, le sang de cet animal, tout en ne possédant pas de propriétés préventives, montre un pouvoir agglutinant évident. Nos résultats confirment pleinement les données de ces auteurs.

2) *Où se forment les agglutinines ?*

Dans la première partie de notre mémoire, nous avons exposé la méthode et les principes que nous avons suivis pour mettre en évidence les corps préventifs dans les organes. En suivant la même méthode, nous avons essayé de déterminer la valeur agglutinante des organes.

Les organes broyés avec du sable, puis étendus avec du bouillon, furent centrifugés après un séjour de 24 heures dans la glacière; nous avons ajouté le suc ainsi obtenu à des quantités croissantes de culture typhique. Après avoir vu que les organes comme le sérum ne perdent que peu de leur valeur agglutinante par la dessiccation, quelquefois nous nous servions de parties d'organes pesées, puis desséchées sur des lames en verre. Une fois desséchées, on peut les broyer sans addition de sable. Nos chiffres se rapportent dans tous les cas au poids de la masse fraîchement retirée. Ainsi, à une rate de

1 gram., nous y ajoutons 3 c. c. de bouillon; pour faire la dilution 1 : 20, nous prenons 4 parties de l'extrait + 16 parties d'émulsion de bacilles. De même : 4 parties du suc + 6 parties du bouillon donnent une dilution de 1 : 10 etc.

L'agglutination par le suc des organes ne s'observe pas aussi aisément que celle produite par le sérum; malgré une centrifugation prolongée, le suc de certains organes (ganglions, foie, poumon) reste toujours un peu louche. Ce manque de transparence est dû à la présence de tout petits grains protoplasmiques, qui, par leurs mouvements browniens, peuvent gêner l'observation.

Pourtant les gros amas de bacilles agglutinés une fois formés, l'œil accoutumé les découvrira bien. Nous avons eu quelquefois l'occasion de voir ces granulations se grouper en petits amas, tout comme les microbes. C'était certainement le précipité de M. Kraus qui fixait ces petits granules les uns aux autres, de la même façon qu'il provoque, selon les expériences de M. Nicolle¹, l'agglutination de la poudre de talc émulsionnée dans des cultures filtrées. Dans ces cas, nous observons dans les tubes macroscopiques un éclaircissement total du liquide; dans les autres, au contraire, l'aspect macroscopique des tubes de contrôle ne correspond pas à l'aspect microscopique, car malgré l'agglutination des microbes, qui ont gagné le fond du tube, le liquide ambiant conserve un léger trouble dû à la présence de petits granules non précipités. C'est toujours le microscope qui nous a servi pour la détermination du pouvoir agglutinant.

Nous avons pris pour ces expériences des précautions identiques à celles qui nous ont guidé pour la détermination du pouvoir agglutinant du sérum. Emulsion : 1 culture sur gélose âgée de 16 heures dans 15 c. c. de bouillon; temps d'observation : une heure; température : celle de la chambre; agglutination-limite : plusieurs amas agglutinés (de 10 à 15 microbes) dans un champ visuel.

Parmi les organes examinés : le foie, les reins, les capsules surrénales montraient un pouvoir agglutinant presque toujours nul. Pour le foie, une fois nous avons observé la valeur de 1 : 10, quand le sérum a été de la valeur de 1 : 800.

1. NICOLLE. Ces *Annales* 1898.

L'xsudat péritonéal ne renferme également que très peu d'agglutinines.

Les résultats relatifs aux organes lymphatiques, à la rate, la moelle, les ganglions lymphatiques sont les suivants :

TABLEAU COMPARATIF DU SÉRUM ET DES ORGANES LYMPHOÏDES

N°	Marque.	Jour.	Sérum.	Moelle.	Rate.	Ganglions.	NOTES
1	A 42	2	20	0	10	0	
2	A 38	2	45	5	0	0	
3	3	4	200	40	40		
4	A 43	5	100	20	20	25	Ganglions non examinés.
5	A 30	7	100	25	10		
6	A 39	9	200	40	20	< 20	
7	A 4	10	300	40	50	20	
8	78/30	11	450	120	80		

Dans un cas seulement, les chiffres se rapprochaient de ceux fournis par le sérum (n° 8); dans tous les autres cas il y avait une infériorité marquée pour les sucs d'organes.

Résultat: *Les organes lymphatiques, qui, au moins dans la moitié des cas observés, renfermaient plus d'anticorps que le sérum, ne renferment pas plus d'agglutinines typhiques.*

Examinons quel est l'effet de la splénectomie sur le développement des agglutinines. Le tableau suivant nous fournira des renseignements sur ce sujet-là.

SPLÉNECTOMIE ET AGGLUTINATION

Nº	Marque.	Jour.	Sérum.	Moelle.
1	D 21	7	80	10
2	D 4	8	200	0
3	D 28	10	600	20
4	D 7	11	800	40
5	D 24	12	500	20

Un simple coup d'œil sur ce tableau permet de constater que la marche du développement n'a pas changé. *Les agglutinines se développaient parfaitement chez les animaux splénectomisés.* (Nous rappelons que c'était absolument le même cas pour les corps préventifs). Aucun des organes ne renfermait les agglutinines en plus grande quantité que le sérum.

Quel est le développement des agglutinines chez les animaux splénectomisés au cours de l'immunisation ? A voir le tableau suivant.

SPLÉNECTOMIE TARDIVE ET AGGLUTINATION

Nº	Marque.	Splénecto- misé après	Saigné à blanc après	Sérum.	Moelle.	Ganglions mésentériq.	NOTES
4	A 26	3 jours.	8 jours.	30	0	5	Diminution.
2	A 20	3 —	7 —	40	5	0	Diminution considérable.
3	A 23	3 —	14 —	400	15	5	Valeur normale.
4	A 24	5 —	10 —	20	10	0	Diminution.
5	A 32	5 —	14 —	5	0	0	Diminution très forte.
6	A 14	5 —	11 —	50	0	—	Légère diminution.

La splénectomie faite quelques jours après l'injection immunisante empêcha dans trois cas sur six (n°s 2, 4, 5.) la formation des agglutinines; dans deux cas (n°s 1, 6) il y avait une

déchéance considérable de la valeur; dans un cas (n° 3), l'opération n'influe en rien la marche du phénomène.

Retenons ces deux faits-ci: 1^o La rate ne renferme pas plus d'agglutinines que le sérum; 2^o l'enlèvement de la rate 3-5 jours après l'injection immunisante empêche la formation des agglutinines. Ces deux faits sont-ils en contradiction? Nullement. En effet, la rate peut très bien renfermer au début de l'immunisation les substances « agglutogènes », c'est-à-dire des substances de provenance microbienne, qui se transforment en agglutinines sans que cette transformation se fasse dans la rate même. Dans la première partie de notre mémoire, où nous exposions notre procédé pour mettre en évidence ces substances intermédiaires « agglutogènes », nous croyons avoir réussi à prouver l'existence réelle des substances agglutogènes dans les rates mêmes. Remarquons, d'autre part, que les substances agglutogènes — comme nous l'avons déjà signalé — se trouvent quelques fois également dans le sang; le fait, que la rate ne représente qu'un des filtres des substances en question, nous explique bien pourquoi la splénectomie tardive est dans une partie des cas sans influence sur le développement des agglutinines.

De tous ces phénomènes mentionnés, puisque nous n'avons pas trouvé des organes qui renfermeraient plus d'agglutinines spécifiques que le sérum, nous ne pouvons tirer des conclusions qu'avec beaucoup de précautions. Les substances agglutogènes se trouvent certainement dans le sang, comme dans la rate, mais l'endroit de leur transformation nous est resté obscur. Est-ce que les agglutinines se forment pourtant dans les mêmes organes et par les mêmes cellules que les corps préventifs? Peut-être. Il nous serait alors permis de supposer qu'aussitôt sécrétées, elles abandonnent les cellules formatrices pour se répandre dans le sang. Ou bien c'est dans le sang même qu'elles se forment?

Ces recherches relatives aux organes lymphatiques, accusés par MM. Pfeiffer et Marx d'être les organes formateurs des agglutinines, n'ont pas abouti à des résultats sûrs. Mais d'autre part, elles ont confirmé notre opinion à propos des relations entre les agglutinines et les corps préventifs. Nous considérons la discordance absolue entre la valeur préventive et agglutinante des rates des animaux immunisés comme une nouvelle preuve de l'existence

séparée des deux substances : des corps préventifs et des agglutinines.

De tous les autres organes, nous n'en avons trouvé qu'un seul, qui nous donnait des valeurs agglutinatives supérieures à celles des sérum, et c'est le poumon.

3) *Recherches sur les substances agglutinantes du poumon.*

Le tableau suivant donne les résultats du titrage comparatif des agglutinines du poumon et du sérum de différents animaux. Nous ferons remarquer qu'avant de broyer nous avons toujours pris soin d'exprimer le sang des capillaires du poumon, aussi complètement que possible.

VALEURS AGGLUTINANTES DU POUMON ET DU SÉRUM CHEZ DES ANIMAUX IMMUNISÉS

N°	Marque.	Immunisé depuis.	Poumon.	Sérum.!	NOTES
1	A 42	2	200	20	
2	A 38	2	> 40 *)	15	
3	A 43	5	200	100	
4	A 30	7	100	100	
5	A 39	9	300	200	
6	D 21	7	200	80	
7	D 4	8	> 30 *)	200	Splénectomisés avant l'injection immunitaire.
8	D 28	10	300	600	
9	D 7	11	200	800	
10	A 20	7	100	10	
11	A 26	8	50	30	
12	A 14	11	50	50	Dératés au cours de l'immunisation.
13	A 32	11	100	5	
14	A 23	14	200	400	

* Le titre-limite n'a pas été déterminé.

L'extrait des poumons provenant des animaux immunisés a montré un pouvoir agglutinant très prononcé. Dans 2 cas

nous notons un titre de 50, dans 5 cas de 100, dans 6 cas de 200, dans 2 cas de 300.

Cette constatation semble étrange : en effet, à notre connaissance, on n'a pas encore signalé ces faits. Nous avons recherché d'abord s'il y a des relations constantes entre la valeur agglutinante des sérums et celle des poumons, ce qui mettrait en évidence le poumon, comme endroit de formation des agglutinines. Un examen approfondi du tableau nous démontre *qu'il n'y a pas de parallélisme entre les deux valeurs*. Dans les premiers jours, le poumon est supérieur au sérum (10-20 fois !) mais plus tard, quand le sérum acquiert des propriétés agglutinantes fortes, la valeur agglutinante ne semble pas être sensiblement augmentée (n°s 8, 9, 14). *Bref, le pouvoir agglutinant du poumon semble être différent et indépendant du pouvoir agglutinant du sérum.*

En présence des titres relativement élevés dans les deux cas provenant du deuxième jour (n°s 1, 2), nous nous sommes demandé si ce pouvoir agglutinant du poumon ne serait pas une faculté inhérente au tissu pulmonaire, en d'autres termes, si le poumon neuf, provenant d'un animal non immunisé, n'agglutinerait pas également ?

Quelques examens ont suffi pour prouver qu'en effet c'est le cas. Voici le tableau comparatif des valeurs agglutinantes du poumon de quatre animaux neufs, en comparaison avec les valeurs agglutinantes des sérums correspondants.

Nos.	Marque.	Poumon.	Sérum.
1	A 51	60	5
2	A 50	100	5
3	A 49	200	20
4	A 48	300	20

Le poumon des cobayes neufs est doué d'un pouvoir agglutinant remarquablement fort, qui dépasse 10-20 fois celui du sérum neuf.

Nous publions quelques notes de notre cahier d'expériences :

Dilution.	Suc du poumon fraîchement préparé (A 49).	SÉRUM (A 49).
1 : 12	En 15 minutes agglutination complète. Énormes masses.	En 15 minutes quelques petits amas composés de 4-6 bacilles.
1 : 20	15 minutes : aggl. complète.	15 minutes : rien; 60 min. groupes de 10-15 individus, beaucoup de microbes isolés.
1 : 40	10 minutes : agglutination complète. Grandes masses agglutinées, etc.	60 minutes : quelques petits amas formés de 4-6 indiv., etc.

La différence est assez éclatante.

Nous venons de découvrir des substances agglutinantes du poumon neuf; nous en réservons l'étude complète pour des recherches ultérieures : ici nous ne ferons qu'exposer les résultats de quelques expériences, relatives aux dites substances.

D'abord nous avons cherché cette action agglutinante chez d'autres espèces d'animaux. Nous l'avons retrouvée chez un lapin (1/50), le rat (1/50), la souris (1/100), de même que chez le cobaye nouveau-né; ainsi ce ne sont pas les microbes aspirés pendant la vie qui sont la cause de cette agglutination. Dans le cas étudié, le poumon agglutinait jusqu'au 1/200, tandis que le sérum n'agglutinait le bacille typhique que jusqu'à 1/20.

D'autre part, nous avons constaté que le colibacille (1/100), les bacilles de la peste (1/60), les vibrions du choléra « Prusse orientale » (1/80), étaient également agglutinés par le suc examiné (A 49 neuf).

Quant à l'aspect microscopique des gouttes suspendues, l'agglutination se présentait sous la forme bien connue. Le suc des poumons peu dilué (1/20, 1/40) paralyse et agglutine presque instantanément les bacilles typhiques, qui forment alors des amas très volumineux. Les petites granulations protoplasmiques pro-

venant des cellules pulmonaires s'agglutinent également, elles se joignent aux amas bacillaires et se précipitent avec eux. De cette précipitation des corpuscules suspendus non microbiens, nous concluons que, probablement, c'est un précipité analogue à celui décrit par M. Kraus, qui est la cause de l'agglutination « pulmonaire ».

En se servant de sucs pulmonaires de plus en plus étendus, l'agglutination cesse d'être complète ; la majorité des microbes conservent — même agglutinés — leur mobilité, et on voit alors des amas composés de 10-20 microbes se remuer vivement, poussés par des bacilles restés isolés et bien mobiles. Nous avions l'impression très nette que l'action paralysante des agglutinines pulmonaires est moins prononcée que celle des agglutinines spécifiques du sérum immunisant. C'est pourquoi les cultures moins mobiles, âgées de 2-3 jours, sont plus vite et plus complètement agglutinées que les cultures jeunes en bouillon.

Les agglutinines du poumon se conservent très bien dans le poumon desséché ; l'extrait des poumons secs et broyés après quatre semaines agglutine aussi bien que le suc fraîchement préparé. Au contraire un *suc conservé* pendant quatre jours dans la glacière perdait une grande partie ($3/4$) de son activité.

Quant à l'action du chauffage, nous avons constaté que l'extrait de poumon y est très sensible. Le pouvoir agglutinant d'un échantillon (A 48), chauffé à 65° pendant 30', est tombé de 300 à 10, quand le sérum provenant du même animal conservait sa valeur initiale (20), presque entièrement (15). Le même suc chauffé à 60° pendant 30' n'agglutinait qu'au $1/20$, alors que la valeur du sérum correspondant n'a pas changé du tout. Nous croyions avoir trouvé un moyen de différenciation des deux sortes d'agglutinines, mais il n'en était rien. Nous avons en effet remarqué que le suc du poumon chauffé à 60° se coagule considérablement, tandis que le sérum ne change pas d'aspect ; cela nous a conduit à penser que c'était la présence de certains corps albuminoïdes dans le suc pulmonaire qui, très vite coagulables, empêcheraient par leur coagulation l'action des agglutinines. Pour examiner cette éventualité, nous ajoutions à un suc pulmonaire récemment préparé un sérum de la valeur agglutinante de 400, et nous chauffions le mélange (fait à parties égales)

à 60° pendant 30'. Au bout de ce temps, le contenu du tube devint tout blanc, crémeux, et parallèlement avec la précipitation de l'albumine le pouvoir agglutinant du liquide s'abaissa jusqu'à 20. Nous voyons que le chauffage ne permet pas la séparation des agglutinines pulmonaires de celles du sérum.

Il est certain que les agglutinines pulmonaires ne sont nullement en relations avec les anticorps. Les sucs de poumons différents, de valeur agglutinante élevée (50, 100, 300) n'ont pu protéger les cobayes contre la dose *minima* mortelle du bacille typhique, aux doses de 0,15, ni de 0,50, ni de 1,00 gramme. Les animaux qui ont reçu le virus additionné avec l'extrait pulmonaire ont, au contraire, toujours succombé plus vite, ce qui est dû vraisemblablement à l'action des autres microbes introduits ensemble avec le suc pulmonaire. La cavité péritonéale des animaux succombés renfermait en effet, en dehors des bacilles typhiques qui y pullulaient, assez souvent d'autres microbes, entre autres un pneumocoque qui, peut-être, représente un hôte habituel du poumon des cobayes. Il est cependant incontestable que les animaux ont succombé à une infection typhique, puisque nous avons retrouvé d'une façon constante le bacille d'Éberth dans le sang.

Les agglutinines pulmonaires ne sont pas en relations avec les agglutinines spécifiques. On ne peut, au contraire, donner aucune preuve de leur non identification avec les agglutinines normales des sérums. Ni l'un, ni l'autre de ces corps n'est spécifique, et leurs valeurs sont assez parallèles. Le tableau de la page suivante donne des valeurs comparatives des sérums et des poumons neufs observés.

Nous tâcherons, dans des recherches ultérieures, d'élucider le rôle et la nature des *agglutinines pulmonaires* : actuellement nous nous contentons de ces données.

Résumons le résultat de nos recherches faites sur le développement et le rôle des agglutinines :

1.) L'injection intrapéritonéale d'une culture typhique chauffée provoque chez le cobaye l'apparition d'un pouvoir agglutinant du sérum.

2.) L'apparition et le développement de ce pouvoir est soumis aux mêmes règles que le développement des anticorps ; il

apparaît vers le 3-4 jour, va en augmentant jusqu'au 10-13 jour et descend lentement. Les valeurs correspondantes varient chez les différents animaux assez sensiblement.

TABLEAU COMPARATIF DE LA VALEUR AGGLUTINANTE DES POUMONS
ET SÉRUMS NEUFS

Valeur du sérum.	Animal.	Valeur du poumon.
< 5	Lapin.....	50
	Rat.....	50
	Souris.....	100
5	Gobaye	100
	Gobaye	60
20	Cobaye	200
	Cobaye	200
	Cobaye	300

3.) Les deux courbes marchent en général à une allure sensiblement parallèle; elles ne sont pas cependant superposables. Les sérums agglutinants à forte dilution sont toujours bien préventifs, mais il y a des sérums d'un pouvoir agglutinant faible qui, néanmoins, renferment des anticorps en assez grande quantité. Le parallélisme n'étant pas absolu, l'identité des agglutinines et des anticorps ne peut être maintenue. Le pouvoir agglutinant ne peut être considéré comme étant la base du pouvoir immunisant; il l'accompagne dans la majorité des cas, mais pas toujours.

4.) Quant aux organes des animaux immunisés: le foie, les reins, les capsules surrénales ne contiennent que des traces des agglutinines.

5.) Les organes lymphoïdes (la rate, la moelle des os, les ganglions) en renferment des quantités variables. sans atteindre la valeur du sérum.

6.) La splénectomie précédant l'injection immunisante n'empêche pas la formation des agglutinines; la splénectomie, faite 3-5 jours après l'injection, empêche nettement la formation des agglutinines qui, dans la majorité des cas, n'apparaissent qu'en quantité inférieure à la normale. La rate doit renfermer des pro-

duits de provenance microbienne, qui provoquent la formation des agglutinines. L'endroit de transformation des substances agglutogènes en agglutinines n'a pu être retrouvé par le titrage comparatif des organes et du sérum; les agglutinines, peut-être aussitôt sécrétées, passent dans le sang, ou bien c'est dans le sang même qu'elles se forment.

7.) Les poumons peuvent être considérés comme les seuls organes du cobaye, qui possèdent dans la majorité des cas observés une valeur agglutinante supérieure au sérum. Cette action de l'extrait pulmonaire, n'étant pas spécifique, doit être considérée comme absolument indépendante de l'action des agglutinines spécifiques du sérum immunisé. Les agglutinines pulmonaires sont faciles à retrouver dans les poumons des animaux neufs de différentes espèces, ainsi que chez le cobaye nouveau-né. Au contact avec des cultures, elles précipitent en les agglutinant les divers microbes (typhus, coli, peste, choléra) ainsi que des petits grains protoplasmiques de provenance cellulaire. Elles sont résistantes à la dessiccation, peu résistantes à un chauffage. Certaines analogies désignent les agglutinines normales comme dérivant des agglutinines pulmonaires.

8.) Le suc du poumon neuf est la première humeur animale connue qui, tout en étant fortement agglutinante, ne renferme pas des corps préventifs.

SUR LA MALTODEXTRINE

Par M. H. POTTEVIN

Dans mon dernier mémoire (ces *Annales*, page 665), j'ai toujours raisonné dans l'hypothèse où l'amidon, sous l'action de l'amylase, donnerait comme uniques produits des dextrines non réductrices et du maltose. Un certain nombre de savants ont admis la formation de corps intermédiaires, dont le pouvoir rotatoire et le pouvoir réducteur correspondraient toujours à des mélanges en proportions convenables de maltose et de dextrine, et qui dans certaines circonstances se comporteraient autrement que les mélanges artificiellement obtenus de ces deux substances. Il faudrait donc leur accorder une individualité propre : tels seraient les dextrines réductrices de Musculus, la maltodextrine de Herzfeld et de Brown et Morris, l'isomaltose de Lintner, etc... Si nous voulons expliquer d'une façon complète le phénomène de la saccharification, il nous faut maintenant étudier ces substances, et examiner dans quelle mesure leur existence, en tant que corps définis, paraît établie ou probable. Je bornerai mon examen aux deux d'entre elles qui s'imposent le plus à l'attention par l'autorité des savants qui les ont décrites, la maltodextrine et l'isomaltose ; ce que je dirai d'elles pourra d'ailleurs s'appliquer à toutes les autres, les arguments invoqués sont toujours les mêmes, la discussion serait toujours la même aussi. Commençons par la première.

Herzfeld a, le premier, préparé une « maltodextrine » ; dans leur mémoire de 1885, Brown et Morris ont décrit une maltodextrine qui ne ressemble pas tout à fait à celle de Herzfeld, mais qui, à leur sens, n'en diffère pourtant pas d'une façon essentielle, car ils disent : « Nous sommes absolument convaincus que Herzfeld a eu entre les mains, quoique à l'état impur, la substance que nous avons nous-même retirée de la portion la

plus soluble dans l'alcool des mélanges en voie de saccharification, et que nous considérons comme une combinaison de maltose et de dextrine. » C'est à celle-ci que je rapporterai mon étude.

La maltodextrine de Brown et Morris n'est pas facile à préparer : elle provient d'une saccharification arrêtée à son début et soumise à des précipitations fractionnées par l'alcool. Le produit est ensuite soumis à une fermentation qui y fait disparaître un peu de sucre, et le résidu non attaqué correspond à :

Maltose	31,6
Dextrine.....	68,4

ce qui fait à peu près une partie de maltose pour deux parties de dextrine.

Mais, pour Brown et Morris, ce corps n'est pas un mélange, c'est une combinaison. Il se distingue en effet d'un mélange artificiel de maltose et de dextrine par les trois points suivants :

1^o La levure de bière (sacch. *Cerivisiæ* des fermentations hautes) est sans action sur la maltodextrine, tandis qu'elle détruit sans peine le maltose surajouté et celui d'un mélange en proportions équivalentes fait avec de la dextrine et du maltose pur ;

2^o Par des précipitations fractionnées à l'alcool, on sépare le maltose presque complètement de la dextrine, tandis qu'on n'arrive pas à défaire la maltodextrine ;

3^o La maltodextrine, traitée par l'extrait de malt à 60°, est intégralement transformée en maltose, ce qui n'a pas lieu pour les dextrines ordinaires qui laissent toujours un résidu non saccharifié (cet argument ne ressort pas nettement de l'expérience citée de Brown et Morris, puisque la dextrine apparente de leur maltodextrine n'a donné que 70 0/0 de sucre ; je prends l'argument tel qu'il est formulé dans leurs conclusions.)

Quand on lit le mémoire de Brown et Morris, on remarque que la dextrine apparente de leur maltodextrine et celle du mélange artificiel qui leur a servi de terme de comparaison, traitées dans les mêmes conditions par la diastase, ne fournissent pas les mêmes quantités de sucre : elles ne sont donc pas identiques, donc pas comparables. N'y aurait-il pas là de quoi expliquer la différence des réactions observées ? Je vais montrer qu'il en est bien réellement ainsi.

La méthode de fermentation adoptée par MM. Brown et Morris, qui consiste à mettre en présence de la solution sucrée une certaine quantité de levure lavée sans précautions aseptiques, et à laisser à l'étuve pendant 12 jours ce mélange au sein duquel la fermentation est vite arrêtée, m'a paru trop exposé à l'intervention des microbes; aussi ai-je procédé d'une autre façon. J'ai préparé de l'eau de levure que j'ai additionnée d'asparagine à la dose de 2 grammes par litre, stérilisée par filtration à la bougie Chamberland et répartie dans des ballons stériles : les mélanges que je voulais faire fermenter étaient stérilisés à l'autoclave, puis ajoutés avec pureté dans les ballons d'eau de levure ainsi préparés : le tout, ensemencé avec une levure de brasserie (sacch. Cerivisiæ de fermentation haute) était mis à l'étuve à 22°-23°; grâce aux précautions prises, on peut laisser l'opération aller à son terme sans craindre l'intervention des microbes.

42 litres d'empois de féculé à 50/0 ont été traités à 65° par 1gr,5 de diastase précipitée, l'opération arrêtée au bout de 1/4 d'heure a donné un mélange contenant pour 100 de matière dissoute :

Maltose.....	15,8
Dextrine.....	84,2

Le liquide concentré à consistance de sirop a été additionné d'alcool absolu, de façon à porter le titre alcoolique à 90 0/0; le précipité a été repris et épuisé à l'ébullition par l'alcool à 70 0/0; en réunissant les liquides d'épuisement et chassant l'alcool, j'ai obtenu un mélange contenant :

A { Maltose.....	45,2
Dextrine.....	54,8

Si la maltodextrine existe, il doit s'en trouver dans ce mélange.

J'ai préparé deux séries de cinq ballons d'eau de levure asparaginée et j'ai ajouté pour 100 c. c. d'eau de levure :

Dans les ballons de la série I, 20 c. c. d'une solution à 25 0/0 du mélange A plus 40 c. c. d'eau.
— II, 60 — — — — 0 —

Tous ces ballons ont été ensemencés avec une levure haute de brasserie étiquetée au laboratoire de l'Institut Pasteur « Levure de Burgelin » et mis à l'étuve à 22°; l'examen fait à époques successives a donné :

	SÉRIE I		SÉRIE II	
	Maltose.	Dextrine.	Maltose.	Dextrine.
Au début	2,26	2,74	6,78	8,22
Après 5 jours.....	4,52	2,74	4,83	8,22
— 10 —	1,37	2,74	4,12	8,22
— 3 semaines...	4,36	2,74	4,12	8,22

Le résidu non fermenté correspond dans l'expérience précédente :

Pour la série I.....	{ Maltose	33,4
	{ Dextrine	66,9
Pour la série II.....	{ Maltose	33,4
	{ Dextrine	66,6

C'est la maltodextrine de Brown et Morris, et, comme dans leurs essais, l'addition d'une certaine quantité de maltose pur est sans influence sur la composition du résidu final.

J'ai préparé deux séries de 4 ballons contenant chacun 50 c. c. d'eau de levure asparaginée, 30 c. c. d'une solution à 25 0/0 du mélange A qui a servi pour l'expérience précédente, et en outre dans la série II, 4 grammes de maltose pur; tous les ballons, ensemencés avec la levure de Burgelin, ont été mis à l'étuve à 22° et examinés au bout de temps variables; ils ont donné :

	SÉRIE I		SÉRIE II	
	Maltose.	Dextrine.	Maltose.	Dextrine.
Au début.....	6,78	8,22	10,78	8,22
Après 4 jours.....	5,10	»	8,40	»
— 8 —	4,20	»	4,25	»
— 45 —	4,20	»	4,20	»

Si la fermentation s'arrête, disent Brown et Morris, c'est que le sucre fermentescible est épuisé. La vie d'un être est quelque chose de très complexe, et c'est s'en faire une idée trop simple que de rapporter ses manifestations aux variations d'un unique facteur; dans le cas présent, les proportions relatives de sucre, de dextrine, et d'alcool, interviennent simultanément pour ralentir l'action de la levure; l'influence prépondérante est celle de la dextrine, et plus exactement de la qualité de la dextrine.

J'ai préparé deux liquides en ajoutant à 50 c. c. d'eau de levure, d'une part (liquide α) 7gr,6 du mélange maltose-dextrine A qui a servi pour les expériences précédentes; d'autre part (liquide β) 3gr,4 de maltose pur et 4 grammes d'une dextrine soluble dans l'alcool à 70° obtenue sans production de sucre, comme je l'ai indiqué précédemment; un troisième liquide γ contient, dans 50 c. c. d'eau de levure, 3gr,4 de maltose pur et 4gr,5 d'une dextrine précipitée par l'alcool à 60 0/0 d'un sirop fourni par une saccharification arrêtée au début.

J'ai ainsi d'une part le mélange maltose-dextrine dont j'ai déjà étudié les qualités fermentatives, d'autre part deux mélanges artificiels faits dans les mêmes proportions, mais avec des dextrines différentes: traitées par la diastase à 60° dans des conditions identiques, les dextrines de ces divers mélanges ont donné :

Dextrine du mélange α	92,5	0/0 de maltose.
— — — β	94,0	—
— — — γ	47,1	—

Les dextrines α et β sont identiques, elles diffèrent de la dextrine γ qui, de son côté, se rapproche de celle employée par Brown et Morris.

Les liquides α , β , γ ont été ensemencés avec la levure de Burgelin et mis à l'éluve à 22°. L'examen fait à époques successives a donné :

	MALTOSÉ DANS 100 c. c.		
	α	β	γ
Au début.....	6,6	6,8	6,8
Après 8 jours	4,0	3,8	1,2
— 45 —	4,0	3,8	0,8

Les liquides α et β de l'expérience précédente se comportent de la même façon; ils contiennent pourtant, mélangés à des dextrines identiques, l'un le maltose apparent de la maltodextrine, l'autre du maltose pur; le liquide γ , qui contient une dextrine différente, est rapidement privé de la presque totalité de son sucre; la qualité de la dextrine intervient manifestement, et nous voyons pourquoi l'expérience comparative faite par Brown et Morris n'a pas la valeur qu'ils lui ont attribuée. Les dextrines diverses qui se montrent différentes quant à leur résistance à la diastase, quant à leur solubilité dans l'alcool, sont différentes aussi quant à la façon dont elles interviennent pour retarder, puis arrêter l'action de la levure de bière.

Du mélange fourni par une dextrinisation faite sans production de sucre, j'ai séparé quatre portions :

L'une A précipitée par l'alcool à 50 0/0.

L'autre B soluble dans l'alcool à 50 0/0, précipitée par l'alcool à 60 0/0.

—	C	—	—	60	—	—	—	70
—	D	—	—	70	—	—	—	—

J'ai préparé des liquides de culture contenant dans 100 c. c. d'eau de levure 6 grammes de ces différentes dextrines et en plus uniformément 5 grammes de maltose pur.

Tous ces liquides ensemencés et mis à fermenter à 22° par la levure de Burgelin ont donné :

	SUCRE RESTANT EN 100 c. c.			
	A	B	C	D
Après 8 jours.....	0,5	0,8	1,3	2,85
— 45 —	0,0	0,4	0,5	2,7
— 24 —	0,0	0	0,4	2,7

A mesure que les dextrines avancent dans la voie de la décoagulation, leur action retardative vis-à-vis de la levure s'accentue.

Les particularités signalées par Brown et Morris sont donc exactement observées, mais l'interprétation qu'ils en donnent n'est pas prouvée; de ce que le maltose apparent de la maltodextrine ne fermente pas, on ne peut pas conclure qu'il est infer-

mentescible, puisque le phénomène se reproduit avec du maltose authentique, uni à une dextrine voisine de celle qui doit entrer dans la maltodextrine.

Le second argument de MM. Brown et Morris est celui-ci : « La maltodextrine ne peut être séparée en maltose et dextrine par un traitement à l'alcool; de quelque façon qu'on s'y prenne, elle se dissout et se précipite en bloc, comme une substance homogène. » Cette affirmation est contredite par Lintner et Düll, et aussi en désaccord avec l'expérience qui suit.

En épuisant par l'alcool à 70 0/0 le mélange fourni par une saccharification arrêtée au début, et faisant fermenter par la levure haute, j'ai préparé un produit correspondant à :

Maltose	31,3
Dextrine	68,7

Une solution sirupeuse de ce mélange a été soumise aux précipitations fractionnées par l'alcool : au sirop chaud j'ai ajouté de l'alcool absolu bouillant jusqu'à ce qu'il se forme un trouble persistant, j'ai laissé refroidir, j'ai filtré et j'ai continué ainsi aussi longtemps que l'addition de quantités nouvelles d'alcool m'a permis d'obtenir un nouveau dépôt; les précipités successifs ont été repris par l'eau, maintenus quelque temps au bain-marie pour chasser l'alcool entraîné puis analysés ; ils ont donné :

Titre alcoolique du liquide au sein duquel s'est formé le précipité.	Poids de ma- tière précipitée.	Composition du précipité.	
		Maltose 0/0	Dextrine 0/0
58	5,7	20	80
70	8,1	26	74
87	11,7	31	69
94	2,4	40	60
Substance restée dissoute dans l'alcool à 94 0/0.	2,4	70	30

Enfin pour discuter l'argument tiré de ce que la dextrine appartenant à la maltodextrine est entièrement transformée en maltose par l'amylase agissant à 60°, je n'ai qu'à me reporter à ce que j'ai dit dans mon dernier mémoire au sujet des dextrines ; j'ai montré que les portions les plus labiles de l'amidon, celles qui, dans une dextrinisation arrêtée à son début, ont déjà atteint l'état de dextrines solubles dans l'alcool fort, sont aussi celles qui, par la suite, seront le plus facilement transformées en maltose ; ce sont ces dextrines que Brown et Morris isolent par leur traitement à l'alcool à 70 0/0 et qu'ils considèrent comme entrant dans la constitution de la maltodextrine ; ces dextrines sont transformables en maltose comme toutes les autres, elles

le sont plus facilement il est vrai, mais cela est indépendant de l'existence d'une combinaison maltose-dextrine.

Aux arguments que nous venons de discuter, Brown et Morris en ont ajouté d'autres de moindre importance :

Je n'en citerai qu'un, réservant les autres pour un prochain travail sur l'isomaltose.

Cet argument est que la maltodextrine dialyse tout d'une pièce, sans séparation de ses éléments constituants. Ceci est en désaccord avec l'expérience qui suit.

J'ai préparé une maltodextrine en procédant comme je l'ai déjà indiqué à plusieurs reprises, j'ai mis dans deux dialyseurs des solutions à 40 0/0, faites l'une (A) avec la maltodextrine, l'autre (B) avec un mélange de maltose pur et de dextrine; celle-ci avait été isolée par l'alcool à 70 0/0 des produits d'une dextrinisation faite sans production de sucre, le mélange était tel que les deux composants s'y trouvaient dans les mêmes proportions que dans le liquide A; j'ai ajouté un peu d'acide phénique pour éviter l'intervention des microbes, l'eau des dialyseurs était changée de six heures en six heures; je mesurais chaque fois les quantités de sucre et de dextrine passées :

	A		B	
	Maltose.	Dextrine.	Maltose.	Dextrine.
Première prise.....	2,5	3,8	2,4	3,2
Seconde —	4,4	2,2	4,2	4,8
Troisième —	0,7	1,6	0,9	1,7

Le mélange A soumis à la dialyse contenait :

Maltose	32,5
Dextrine.....	67,5

La dialyse marche d'un pas à peu près égal pour la maltodextrine, qui ne passe pas entière, et pour le mélange artificiel; les diverses dextrines dialysent avec des vitesses différentes; celles qui sont le plus solubles dans l'alcool sont celles qui passent le plus vite, elles passent presque aussi vite que le maltose; comme ce sont elles qui entrent dans la maltodextrine, on conçoit très bien que dans certains cas il puisse y exister entre la composition de la substance qui reste sur le dialyseur et celle de la substance qui l'a traversé une différence moins grande encore que celle que j'ai trouvée dans l'expérience précédente.

PRÉPARATION DE LA CASÉINE COMME AGENT PYOGÈNE

PAR J. COLARD.

On est souvent obligé, dans les laboratoires de bactériologie, de se servir de produits connus sous le nom d'*aleuronates* pour obtenir du pus : c'est Buchner qui, en 1890, a proposé la caséine végétale, substance produisant facilement la suppuration de certains tissus et principalement de la plèvre. C'est au moyen du pus ainsi obtenu que l'on peut étudier les extraits leucocytaires, les propriétés préventives et bactéricides, etc.

Les aleuronates fournis par le commerce sont malheureusement des produits le plus souvent impurs : en tout cas, au laboratoire de bactériologie de Liège, on n'eut guère que des mécomptes avec les substances fournies sous ce nom par divers fournisseurs français et allemands. Nous nous sommes décidés à en préparer nous-mêmes, et voici la méthode qui a donné le meilleur produit, doué d'un pouvoir pyogène très considérable, comme l'a constaté M. Gengou dans ses expériences.

On prépare d'abord du gluten par le procédé ordinaire, en malaxant sous un filet d'eau de la farine de froment renfermée dans un petit sac de toile, et cela jusqu'à ce que l'eau passe incolore, ce qui indique que tout l'amidon est éliminé. Un kilogramme de farine donne environ 150 grammes de gluten humide. Cent grammes de ce gluten sont mis en macération avec 4 litres d'eau contenant 4 grammes de potasse caustique par litre ; on laisse en contact pendant quelques jours en agitant de temps en temps jusqu'à dissolution du gluten ; on décante ou on passe à la toile ; on ajoute au liquide de l'acide acétique en très léger excès. Le gluten purifié se reprécipite : cette précipitation est activée en chauffant légèrement si l'opération se fait en hiver.

On épouse le gluten successivement par l'alcool à 60°, puis par l'alcool à 80°, enfin par l'alcool absolu à l'effet de dissoudre la fibrine végétale contenué dans le gluten. On sèche doucement le résidu insoluble qui est la caséine végétale. Le produit doit

être conservé en flacon dessiccateur. Un kilogramme de farine en fournit environ 20 grammes.

La caséine du gluten est presque insoluble dans l'eau, à l'état sec. Elle se dissout dans les solutions alcalines diluées d'où l'HCl étendu la reprécipite; ce précipité se redissout dans l'eau par l'addition de quelques gouttes de solution sodique. En solution alcaline, elle donne avec le ferrocyanure potassique un précipité qui devient plus fort par l'addition d'acide acétique. Ce caractère la distingue de la caséine protéique qui ne donne pas de précipité avec le ferrocyanure.

La caséine végétale est très leucocytophile en solution faiblement alcaline. Pour l'employer, on la fait digérer avec une solution de potasse à 0,5 0/0 à la température de 37°. On la reprécipite par l'HCl dilué, puis on la redissout dans l'eau additionnée de quelques gouttes de solution de soude caustique.

Pour provoquer la suppuration, il suffit d'injecter dans la plèvre 8 à 10 c. c. de cette solution alcaline à 5-10 0/0 : le lendemain, on retire une quantité à peu près égale de pus.

On peut aussi retirer la caséine végétale des graines de légumineuses.

Liège, Institut bactériologique, 1899.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.